

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-135973

(43)Date of publication of application : 30.05.1995

(51)Int.Cl.

C12N 9/50
C07K 14/195
C12N 15/09
C12Q 1/37
//(C12N 9/50
C12R 1:01)

(21)Application number : 05-307084

(71)Applicant : SUNTORY LTD

(22)Date of filing : 15.11.1993

(72)Inventor : YAMAMOTO KENJI
KADOWAKI TOMOKO
OKAMOTO KUNIAKI
YONEDA MASAHIRO

(54) ENZYME ORIGINATED FROM PERIODONTIC BACTERIA, ITS DETERMINATION AND ANTIBODY AGAINST THE ENZYME

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide an enzyme from periodontic bacteria enabling sure determination of the progress and activity of periodontosis without using the experience of skilled person and expectable as a preventing and treating agent for periodontosis in addition to the use as an analytic reagent.

CONSTITUTION: This invention relates to an enzyme originated from Porphyromonas gingivalis and having the following enzymological properties, a determination method for the enzyme and an antibody against the enzyme. (1) Action, decomposing periodontal tissue and inhibiting inflammatory cells; (2) substrate specificity, exhibiting high decomposition activity against various proteins such as collagen and immunoglobulin and strong specific decomposition activity against synthetic fluorescent substrate; (3) optimum pH of 7-8 and stable pH of 4-9; (4) suitable working temperature range, from room temperature to 37° C; (5) molecular weight, about 50kDa by gelfiltration and about 44kDa by SDS get electrophoresis; (6) isoelectric point, pH 5 to 5.5.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-135973

(43) 公開日 平成7年(1995)5月30日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/50		9152-4B		
C 0 7 K 14/195		8318-4H		
C 1 2 N 15/09	Z N A			
C 1 2 Q 1/37		6807-4B		
		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
審査請求 未請求 請求項の数 4 F D (全 15 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願平5-307084	(71) 出願人	000001904 サントリー株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
(22) 出願日	平成5年(1993)11月15日	(72) 発明者	山本 健二 福岡県福岡市東区高美台3-38-5
		(72) 発明者	門脇 知子 福岡県福岡市東区馬出4-1-16-204
		(72) 発明者	岡元 邦彰 福岡県福岡市東区箱崎2-54-1 箱崎公団407
		(72) 発明者	米田 雅裕 福岡県福岡市早良区重留3-7-3
		(74) 代理人	弁理士 小野 信夫 (外1名)

(54) 【発明の名称】 歯周病原性菌由来酵素およびその測定方法並びに当該酵素に対する抗体

(57) 【要約】 (修正有)

【構成】 次の酵素学的性質を有する、ポルフィロモナス・ジンジバリス由来酵素およびその測定方法並びに当該酵素に対する抗体。

(1) 作用： 歯周組織に対する分解能を有し、また炎症性細胞に対する障害活性を有する。

(2) 基質特異性： コラーゲン、免疫グロブリンなどの各種蛋白質に対して高い分解能を有し、合成蛍光基質対し特異的に強い分解活性を示す。

(3) pH： 至適pHは7～8、安定pH4～9

(4) 作用適温の範囲： 室温から37℃

(5) 分子量： ゲル濾過で約50kDa、SDSゲル電気泳動で約44kDa

(6) 等電点： pH5-5.5

【効果】 歯周病の進行状況と活動度を経験に依存することなく的確に把握でき、酵素に対する抗体は、分析用試薬の他、歯周病の予防、治療剤としての利用も期待できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の酵素学的性質を有する、ポルフィロモナス・ジンジバリス (*Porphyromonas gingivalis*) 由来酵素：

(1) 作用；コラーゲンを主体とする歯周組織に対し直接的な分解能を有するとともに、好中球などの炎症性細胞に対して障害活性を有する。

(2) 基質特異性；コラーゲンや免疫グロブリンなどの各種蛋白質に対して高い分解能を有する一方、合成蛍光基質 α -ブチルオキシカルボニル-L-フェニルアラニル-L-セリル-L-アルギニン-4-メチルクマリル-7-アミド (Boc-Phe-Ser-Arg-MCA) およびカルボベンゾイル-L-フェニルアラニル-L-アルギニン-4-メチルクマリルアミド (Z-Phe-Arg-MCA) に対し特異的に強い分解活性を示す。

(3) 至適 pH 及び安定 pH；至適 pH は蛋白質基質及び合成基質のいずれの場合も 7~8 にあり、pH 4~9 の範囲で安定である。

(4) 作用適温の範囲；室温から 37℃

(5) 活性化；システイン、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトールなどの SH 基還元剤によって著しく活性化される。

(6) 阻害物質；キモスタチン、ロイペプチン、E-64、アンチパイン、EDTA、TPCK、TLCK などにより強い活性阻害を受ける。

(7) 分子量；ゲル濾過で求めた見かけ上の分子量は約 50 kDa、SDS ゲル電気泳動で決定した分子量は約 44 kDa である。

(8) その他；等電点 pH 5-5.5

【請求項2】 以下の工程を有することを特徴とする請求項1記載の酵素の測定方法；

(1) 試料の一部を、EDTA 及びロイペプシン存在下で請求項1記載の酵素の基質と反応させ、酵素活性を測定する工程、

(2) 当該試料の一部に請求項1記載の酵素に対する特異抗体を作用させた後、当該反応液を固相と液相に分離し、次いで上記(1)に従って酵素活性を測定する工程、

(3) 工程1の酵素活性より工程2の酵素活性を差し引き、請求項1記載の酵素活性量を算出する工程。

【請求項3】 特異的に請求項1記載の酵素と結合する抗体。

【請求項4】 次の(a)~(d)

(a) 特異的に請求項1記載の酵素と結合する抗体、

(b) 請求項1記載の酵素に特異的に認識される基質、

(c) ロイペプチンおよび

(d) EDTA

を含むことを特徴とする歯周病原性菌由来酵素測定用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は歯科における重要疾患、とくに歯周病の診断および治療において有用な歯周病原性菌由来酵素およびその測定方法並びに当該酵素に対する抗体に関する。

【0002】

【従来の技術】歯周病は今日の高齢化社会において歯科領域の最も重要な疾患となっている。一生涯、自分の歯でものを食べたいという欲求が益々強くなる一方で、歯の喪失を引き起こす歯周病は確実に年齢とともに増え続けている。歯周治療を進める上で病態を把握する歯周診査ならびに診断は極めて重要である。

【0003】現在、歯周診査や診断に使用されている臨床パラメーターとしては(1)歯周ポケットの深さ(probing depth)や付着の喪失量(attachment loss)、(2)歯の動揺度、(3)歯肉の炎症状態を現す指数(gingival index)、(4)歯垢の累積状態を現す指数(plaque index)、(5)出血を現す指数(gingival bleeding index)、(6)X線写真からの歯槽骨吸収状態、(7)歯肉溝の滲出液量(GCF volume)などの項目が知られている。

【0004】しかし、これらの臨床パラメーターは以下の点で問題を残しており、十分に満足が行くものではなかった。まず、歯周ポケットの深さや付着の喪失量の測定やX線写真からの歯槽骨吸収の程度の判定などは、歯周病の最も重要な病態である歯周組織の破壊の程度を知るための有用な臨床パラメーターとして汎用されているが、これらはあくまでも過去の炎症による歯周組織破壊の結果を示すものであり、現状における歯周組織破壊の活性度や歯髄などへの影響を知る手掛かりとはなり得ない。

【0005】また、歯肉指数(gingival index)、歯垢指数(plaque index)、出血指数(gingival bleeding index)、歯の動揺の程度および歯肉溝の滲出液量(GCF volume)などは現今の病状を反映するパラメーターであるが、判定基準が極めて大まかであったり、特殊な測定装置を必要とする(GCF volume)など、複雑なステップで進行する歯周炎の現状の活動度の診断や治療の必要性を判定するための臨床パラメーターとしては正確さや再現性、客観性に欠ける難点があった。このように、歯周病の診断等において客観的な診査方法や正確な診断方法等はないのが現状であり、これは当該分野において世界的な問題となっている。

【0006】最近、歯周病原性菌のひとつであるポルフィロモナス・ジンジバリス(*Porphyromonas gingivalis*)由来の複数の酵素を適当な基質及び/又はアクチベーターを用いて測定することにより歯周病の診断を行う方法が見いだされている(国際出願公開公報；W092/07086)、当該発明方法では酵素の特定がなされていないことや、測定に用いる基質の特異性や感度が

低いなどの欠点があり、さらにこれらの方法で測定される酵素活性が生体由来の各種インヒビター (endogenous inhibitors such as serpins and cystatins) でどの程度影響を受けるのか不明であり、これらの酵素がインヒビターによって影響されれば、当該発明方法で測定された酵素量は正確なものとはいえず、当該方法は歯周病の診断に用いるには未だ不十分なものであった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】歯周病の診断等に関して、当該病状の進行状況を客観的に知ることは、その後の治療をどのように行うかを判断するに際して非常に重要であるが、上記のように未だ十分に満足できる方法が提供されておらず、歯周病の進行状況を簡便に判断できる方法の開発が切望されていた。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、歯周病原性菌のひとつであるP. ジンジバリス (P. gingivalis) の歯周病における作用について検討していたところ、当該菌体がプロテアーゼである新規な酵素を産生しており、この酵素が歯周病に関与していることを見いだした。

【0009】また本発明者らは、歯周病の病状の進行に比例して歯周病臨床患者の歯肉溝滲出液中で上記酵素活性が上昇し、歯周病の病勢と当該酵素の活性上昇の程度に相関関係があるという新たな知見を見いだした。

【0010】特に、当該酵素は歯周組織の主要成分であるタイプIコラーゲンを強く分解するコラゲナーゼ活性を有するなど、歯周組織の直接的破壊を引き起こすことや好中球などの炎症性細胞に対して機能障害を引き起こし生体防御系を破壊するなど、歯周病の発症や進行と密接に関係する性質や機能を有することが明らかとなり、従来より知られているP. ジンジバリス由来の酵素を測定するよりも当該酵素を測定することの方が歯周病の病状の進行を知る上で非常に有意であるということを見いだした。

【0011】本発明は、上記知見に基づき完成されたものであり、P. ジンジバリスの産生する前記酵素およびこの酵素の検出方法を提供するものである。

【0012】本発明の酵素は、P. ジンジバリスに属する微生物を利用し、例えば、以下のようにして得ること

ができる。まず、P. ジンジバリスに属する微生物を培養し、その培養上清に硫酸を加えて70%飽和とした後、生じた沈殿を遠心分離等の手段によって集め、これを、例えば非イオン性界面活性剤を含むリン酸緩衝液に対して透析する。次いで、遠心透析上清をリン酸緩衝液等で平衡化したDEAEセファセル等のカラムにかけ、得られる非吸着分画を濃縮し、さらにCM-トヨパール等のカラムにかけ、活性画分を溶出する。最後に、溶出画分を濃縮、透析した後、pH3.5~10の範囲の等電点分離にかけ、pH5.0~5.5の活性画分を集め、更に濃縮、透析後、TSKゲルG2000SW等のゲル濾過に付すことにより精製酵素として得ることができる。

【0013】斯くして得られる本発明の新規酵素 (プロテアーゼ) は以下に示すような特異的な酵素学的性質を持つ。

【0014】(1) 作用; コラーゲンを主体とする歯周組織に対し直接的な分解能を有するとともに、好中球などの炎症性細胞に対して障害活性を有する。この酵素の分解様式は比較的非特異的であり、エンドプロテナーゼ (Endoproteinase) として作用する。

(2) 基質特異性; コラーゲンや免疫グロブリンなどの各種蛋白質に対して高い分解能を有する一方、合成蛍光基質 $\text{m-ブチルオキシカルボニル-L-フェニルアラニル-L-セリル-L-アルギニン-4-メチルクマリル-7-アミド (Boc-Phe-Ser-Arg-MCA)}$ およびカルボベンゾイル-L-フェニルアラニル-L-アルギニン-4-メチルクマリルアミド (Z-Phe-Arg-MCA) 等を特異的に分解するアルギニルエンドペプチターゼ (arginyle ndopeptidase) 活性を有する。

【0015】(3) 至適pH及び安定pH; 図1に示すように、至適pHは蛋白質基質及び合成基質のいずれの場合も7~8にあり、pH4~9の範囲で安定である。

(4) 作用適温の範囲; 室温から37℃である (図2参照)。

【0016】(5) 活性化; 表1に示すように、システイン、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトールなどのSH基還元剤によって著しく活性化される。

表 1

チオール化合物	濃 度 (mM)	残存活性 (%)
な し	—	100
システイン	1	7760
	5	8530
	10	7690
2-メルカプトエタノール	1	7290
ジチオスレイトール	1	8410

【0017】(6) 阻害物質；表2に示すように、キモスタチン、ロイペプチン、E-64、アンチパイン、EDTA、TPCK、TLCKなどにより強い活性阻害

を受ける。しかし、シスタチングループ（卵白シスタチンやヒトシスタチンSなど）では全く影響を受けない。

表 2

化 合 物	濃 度	残存活性 (%)
な し	—	100
キモスタチン	50 μ g/ml	2
TPCK	1mM	5
TLCK	1mM	20
PMSF	1mM	76
エラストチナール	50 μ g/ml	83
DFP	1mM	111
ロイペプチン	50 μ g/ml	0
E-64	50 μ g/ml	4
アンチパイン	50 μ g/ml	7
ヨード酢酸	1mM	33
卵白シスタチン	50 μ g/ml	118
ヒトシスタチンS	500 μ g/ml	125
ペプスタチン	50 μ g/ml	112
EDTA	1mM	18
EGTA	1mM	45
ホスホラミドン	1mM	46
CaCl ²	1mM	133
MgCl ²	1mM	139
FeCl ²	1mM	87
ZnCl ²	1mM	68

【0018】(7) 分子量；ゲル濾過で求めた見かけ上の分子量は約50kDa、SDSゲル電気泳動で決定した分子量は約44kDaである。

(8) その他；等電点pH5-5.5

【0019】そして上記酵素は、下の式で示される構造

またはこれと類似するペプチド配列を有すると推定される。なお、式中には当該ペプチド配列をコードする塩基配列も併せて示した。

【0020】

【化1】

TTTAATGCATAAATACAGAAGGGGTACTACACAGTAAATCATATCTAATTTTCATCAAA 60
 ATGAAAAACTTGAACAAGTTTGTTCGATTGCTCTTTGCTCTTCCTTATTAGGAGGAATG 120
 M K N L N K F V S I A L C S S L L G G M 20
 GCATTTGCGCAGCAGACAGAGTTGGGACGCAATCCGAATGTCAGATTGCTCGAATCCACT 180
 A F A Q Q T E L G R N P N V R L L E S T 40
 CAGCAATCGGTGACAAAGGTTCACTCCGTATGGACAACTCAAGTTCAACCGAAGTTCAA 240
 Q Q S V T K V Q P R M D N L K P T E V Q 60
 ACCCCTAAGGGAATGGCACAAGTCCCGACCTATACAGAAGGGGTTAATCTTTCCGAAAA 300
 T P F K G M A Q V P T Y T E G V N L S E K 80
 GGGATGCTACGCTTCOCATTCATCAAGCTCTTTGGCGGTTTCAGACACTCGTGAGATG 360
 G M F T L P I L S R S L A V S D T R E M 100
 AAGGTAGAGGTGTTTCTCAAGTTTCATCGAAAGAAAAATGCTGATTGACCCCTCC 420
 K V E V V S S K F I S K K N V L I A P S 120
 AAGGCGATGATTATGCGTAAAGAGATCGAAAAAGATCCCTTACGTTTATGGAAAGAGC 480
 K G M I M R N E D P K K I P Y V Y G K S 140
 TACTCGCAAAACAAATCTTCCCGGGAGAGATCGCACGCTTGATGATCCTTTATCCCTT 540
 Y S Q N K F F P G E I A T L D D P P I L 160
 CGTGTGTGCTCGCAGGTTGTAACTTTGCGCTTTGCGAGTATAACCTGTGACAAAG 600
 R D V R G Q V V N F A P L Q Y N E V T K 180
 ACGTTGCGCATCTATACGGAATCACTGTGGCAGTGAGCGAACTTCGGAACAGGCAAA 660
 T L R I Y T E I T V A V S E T S E Q G K 200
 AATATTCTGAACAAAGAAAGTACATTGCGCGCTTTGAAGACACATACAAAGCGCATGTC 720
 N I L N K K G T F A G F E D T Y K R M F 220
 ATGATACAGAGCGGGCGTTACACACCGGTAGAGGAAAAACAAATGGTGTATGATC 780
 M N Y E F G R Y T P V E E K Q N G R M I 240
 GTCATGTCAGCCAAAGATATGAGGGAGATATTAAGATTTGTTGATGGAAAAACCAA 840
 V I V A K K Y E G D I K D F V D W K N Q 260
 CGCGGTCTCGGTACCGAGGTGAAAGTGGCAGAAGATATTGCTTCTCCCGTTACAGCTAAT 900
 R G L R T E V K V A E D I A S P V T A N 280
 CCTATTACAGAGTTGTTAAGCAAGATACAGAAAGAGTAAATGATTTGACCTATGTT 960
 A I Q Q F V K Q E Y E K E G N D L T Y V 300
 CTTTGGTTGGCGATCAAAAGATATTCTGCGCAAAATTACTCCGGGATCAAAATCCGAC 1020
 L L V G D H K D I P A K I T P G I K S D 320
 CAGGTATATGGACAAATAGTAGGTAATGAACACTACACGAAGCTTCATCGGTGCTTTC 1080
 Q V Y G Q I V G N D H Y N E V F I G R F 340
 TCATGTGAGAGCAAGAGGATCTGAAGACACAAATCGATCGGACTATTCATATGAGCGC 1140
 S C E S K E D L K T Q I D R T I K Y E R 360
 AATATAACCGGAGACAAATGGCTCGGTGAGGCTCTTTGTATTGCTTCGGCTGAAGGA 1200
 N I T T E D K W L G Q A L C I A S A E G 380
 GGCCCATCCGACAGCAATGGTGAAGTGATATCCAGCATGAGAAATGTAATCGCCAATCTC 1260
 G P S A D N G E S D I Q H E N V I A N L 400
 CTTACCCAGTATGGCTATACCAAGATTATCAAAATGTTATGATCCGGGAGTAACCTCTAAA 1320
 L T Q Y G Y T K I I K C Y D P G V T P K 420
 AACATTATTGATGCTTTCAACGGAGGAATCTCGTTGGTCAACTATACGGGCCACGGTAGC 1380
 N I I D A F N G G I S L V N Y T G H G S 440
 GAAACAGCTTGGGGTACGTCTCACTTCGGCACCACTCATGTGAAGCACCTTACCAACACC 1440
 E T A W G T S H F G T T H V K Q L T N S 460
 AACAGCTACCGTTTATTTTCGACGTAGCTTGTGTGAATGGCGATTTCCTATTTCAGCATG 1500
 N Q L F F I F D V A C V N G D F L F S M 480
 CCTTGCTTCGCAAGCCCTGATGCGTGCACAAAAAGATGGTAAGCCGACAGGTACTGTT 1560
 P C F A E A L M R A Q K D G K P T G T V 500
 GCTATCATAGCGTCTACGATCAACCACTCTTGGGCTTCTCTATGCGCGGGCAGGATGAG 1620
 A I I A S T I N Q S W A S P M R G Q D E 520
 ATGAACGAAATCTGTGCGAAAAACCCCGAACACATCAAGCGTACTTTCCGGTGGTGTG 1680
 M N E I L C E K H P N N I K R T F G G V 540
 ACCATGAACGGTATGTTGTATGCTGGAAGTATAAAAGGATGGTGAGAAGATGCTC 1740
 T M N G M F A H V E K Y K K D G E K M L 560

[化2]

```

GACACATGGAGCTTTTCGGCGACCOCTCGCTGCTGTTCTGACACTTGTCCCGACCAAA 1800
D T W T V F G D P S L L V R T L V F T K 580
ATGCAGGTACGGCTCCGGCTCAGATTAAATTGACGGATGCTTCAGTCAACGTATCTTGC 1860
M Q V T A P A Q I N L T D A S V N V S C 600
GATTATAATGGTGTCTATTGCTACCATTTACGCCAATGGAAGATGTTGCGTTCTGCAGTT 1920
D Y N G A I A T I S A N G K M F G S A V 620
GTCGAAAATGGAACAGCTACAATCAATCTGACAGGTCTGACAAATGAAAGCACGCTTACC 1980
V E N G T A T I N L T G L T N E S T L T 640
CTTACAGTAGTTGGTTACAACAAAGACGGTTATTAAGACCATCAACACTAATGGTGAG 2040
L T V V G Y N K E T V I K T I N T N G R 660
CCTAACCCCTACCAGCCGTTTCCAACCTTGACAGCTACAACGCGGGTCAAGAAAGTAAAG 2100
P N P Y Q F V S N L T A T T Q G Q K V T 680
CTCAAGTGGGATGCAACGAGCAGAAAACCAATGCAACCACTAATACCGCTCGCAGCGTG 2160
L K W D A P S T K T N A T T N T A R S V 700
GATGGCATACGAGAAATGGTTCTTCTGTGTCAGTCAGCGATGCCCCGAACTTCTTCCGAGC 2220
D G I R E L V L L S V S D A P E L L R S 720
GGTCAAGGCGAGATTGTTCTTGAAGCTCAGGATGTTTGAATGATGGATCGGGTATCAG 2280
G Q A E I V L E A H D V W N D G S G Y Q 740
ATTCTTTTGGATGACAGCATGATCAATATGACAGGTTATACCCAGTGATACCCATACT 2340
I L L D A D H D Q Y G Q V I P S D T H T 760
CTTTGCGGAACTGTAGTGTCCCGGCAATCTGTTGCTCGTTCGAATATATCTGTTCCG 2400
L W P N C S V P A N L F A P F E Y T V P 780
GAAATGCGAGTCCCTTCTGTTCCCTACCAATATGATAATGGATGGTACTGCACTCCGTT 2460
E N A D P S C S P T N M I M D G T A S V 800
AATATACCGCGCGAACTTATGACTTTGCAATGCTGCTCTCTCAAGCAATGCAAGATT 2520
N I P A G T Y D F A I A A P Q A N A K I 820
TGGATTGCGGACAAGGACCGACGAAAGAGATGATTATGATTGGAACCGGTAAAAA 2580
W I A G Q G P T K E D D Y V F E A G K K 840
TACCATTTCCTTATGAAGAAGATGGGTAGCGGTGATGGAACCTGAATTGACTATAAGCGAA 2640
Y H F L M K K M G S G D G T E L T I S E 860
GGTGGTGAAGCGATTACACCTATCTGCTATCTGACGGCAGCAAGATCAAGGAAGGT 2700
G G S D Y T Y T V Y R D G T K I K E G 880
CTGACCGAAAACGACCTACCGGATGACGGAATGAGTGCAAACTCTCATGATATTCGCTA 2760
L T E T T Y R D A G M S A Q S H E Y C V 900
GAGGTTAAGTACGACGCGCGCTATCTCCGAAGGTTTGTGTTGATTATATTCCTGACGGA 2820
E V K Y A A G V S P K V C V D Y I P D G 920
GTGCGACAGCTAACGGCTCAGAAGCCTTACACGCTGACAGTTGTTGGAAGACGATCAG 2880
V A D V T A Q K P Y T L T V V G K T I T 940
GTAACCTTGCAAGCGAAGCTATGATCTACGACATGAACGGTCTGCTGCGACCGCGT 2940
V T C Q G E R M I Y D M N G R R L A A G 960
CGCAACACAGTTGTTTACAGCGCTCAGGCGGCTACTATGCAGTCATGGTTGCTGTTGAC 3000
R N T V V Y T A Q G G Y Y A V M V V V D 980
GGCAAGTCTTACGTAGAGAACTCGCTGTAAGTAATCTGCTCTGGACTCGGAGACTTT 3060
G K S Y V E K L A V K * 991
GTCGAGACACTTTTAAATATAGGCTCTGTAATTGTC 3094

```

【0021】上記の本発明酵素の分析に使用できる、本発明の酵素を特異的に認識する抗体は、本発明酵素を用い、例えばフロインド (Freund) の完全アジュバントを用いた公知の方法で作成することができる。当該抗体の取得方法を以下に概略すると次の通りである。

【0022】すなわち、前記のようにして調製した、精製酵素液 (約1mg) を等量のプロインドの完全アジュバントと混和し、その懸濁液を家兎等の皮下に数ヶ所に渡って注射し、これを2週間間隔で2回繰り返す。その後、ブースターを1回行って抗血清を採取する。採取した抗血清を、硫酸処理及びプロテイン A-セファロース (ファルマシア社、スエーデン) カラムクロマトグラフィーすることにより、IgG分画として抗体を得ることができる。

【0023】また、本発明の酵素と特異的に結合する合成基質を市販の入手可能な合成蛍光基質から見いだすに

は、例えば次の如くすれば良い。すなわち、10 μ Mの基質、5mMシステインおよび当該酵素を含む反応溶液 (20mMリン酸緩衝液、pH7.5) を40℃で10分間加温した後、10mMヨード酢酸溶液 (pH5) を加えて反応を停止させ、励起波長460nm、蛍光波長380nmで4-メチルクマリル-7-アミド (AMC) の遊離を測定し、AMCを遊離する基質を本発明の酵素と特異的に結合する合成基質とすれば良い。

【0024】各種の合成蛍光基質を用いた時の同一条件下での分解活性、すなわち、本発明酵素の基質特異性を表3に示す。この結果から、本発明酵素に特異的に認識される基質としては、Z-Phe-Arg-MCA、Boc-Phe-Ser-Arg-MCA、Boc-Gln-Ala-Arg-MCA等が選ばれる。これらの基質はペプチド研究所 (大阪) から購入可能である。

【0025】

表 3

基 質 合成基質 (10 μ M)	活 性 (μ mol/mg/min)	最大活性 (%)
Boc-Phe-Ser-Arg-MCA	16600	100
Boc-Gln-Ala-Arg-MCA	11600	70
Z-Phe-Arg-MCA	16400	99
Z-Arg-Arg-MCA	1300	8
Boc-Glu-Lys-Lys-MCA	0	0
Boc-Val-Leu-Lys-MCA	160	1
Arg-MCA	670	4
Lys-MCA	0	0
Leu-MCA	1500	9
Ala-MCA	170	1
Gly-Pro-MCA	2000	12
Lys-Ala-MCA	500	3
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	0	0
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA	0	0
Suc-Ala-Pro-Ala-MCA	0	0
Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-MCA	0	0
Suc-Gly-Pro-MCA	0	0

【0026】歯周領域に存在する上記のP.ジンジバリスの産生する酵素活性は、例えば下記方法により当該酵素を特異的に認識する合成基質及び／又は当該酵素を特異的に認識する抗体等を用いて測定することができる。

【0027】歯周領域に存在する本発明の酵素の測定方法は、具体的には以下のようにして行うことができる。

【0028】(1) 被検液の採取；被検液を採取する被検者としては、全身的疾患を持たない軽度から高度の歯周炎を有する臨床患者が適当であり、被検部位はX線写真上で明らかな垂直性の歯槽骨の吸収が認められる歯周ポケットを選択する。

【0029】歯肉溝滲出液(GCF)の採取は、まず簡易防湿後、歯肉縁上プラークを注意深く除去し、ペリオパーストリップス(Harco Electronics, Canada)を用いてGCFを採取する。採取は、3枚のペーパーストリップスを用いて30秒間ずつ連続的に行なう。GCF量は、2番目のペーパーストリップスをペリオロン6000(Harco Electronics, Canada)にかけて単位時間あたりに滲出してくる液量を計測する。

【0030】(2) 酵素活性の測定；予め氷冷しておいた300 μ lのリン酸緩衝生理食塩水液(pH7.4)に3枚のペーパーストリップスを浸し、0℃で5～6時間放置した後、5分間の超音波処理を行い、遠心上清を試料液として使用する。まず、被検液の一部を用い、これに一定量の基質(例えば、Z-Phe-Arg-MCA、Boc-Phe-Ser-Arg-MCA等)およびシステインを加え、40℃程度で加温した

後、ヨード酢酸溶液等を加えて反応を停止させる。ついで、励起波長460nm、蛍光波長380nmで4-メチルクマリル-7-アミド(AMC)の遊離を測定し、上記基質に対する分解活性から酵素活性を求めることができる。

【0031】この時、EDTA(10mM)及びロイペプチン(50 μ M)の存在で阻害される活性量が目安としての当該酵素量となる(図3参照)。しかし、この段階での酵素量は、使用する基質が当該酵素のみによって認識されるものではなく、それ以外のプロテアーゼによっても分解を受ける可能性がある。従って、更に、被検液の一部に当該酵素に対する特異抗体を加え、37℃で10分間反応させた後、反応液を遠心分離して固相(免疫複合体)と液相に分離し、液相中の上記基質に対する分解活性を測定して固相へ移行した活性量を算出すれば、より正確な当該酵素量が決定されたことになる。

【0032】従って、より正確な酵素活性を求めるためには次の工程をとれば良い。

(1) 試料の一部を、EDTA及びロイペプチン存在下で本発明酵素の基質と反応させ、酵素活性を測定する、(2) 当該試料の一部に本発明酵素に対する抗体を作用させた後、当該反応液を固相と液相に分離し、次いで上記(1)に従って酵素活性を測定する、(3) 工程1の酵素活性より工程2の酵素活性を差し引き、本発明酵素活性量を算出する。

【0033】また、本発明の酵素をより簡便に測定するためには、(a) 特異的に請求項1記載の酵素と結合

する抗体、(b) 請求項1記載の酵素に特異的に認識される基質、(c) ロイペプチンおよび(d) EDTAを含む歯周病原性菌由来酵素測定用キットを利用すれば良い。

【作用】本発明は、後記表4に示すように、本発明酵素がP. ジンジバリスに特有のものであることに基づくものである。そして、歯周病患者の歯周ポケットにおける本発明酵素の活性上昇と歯周病の症状との関係は、以下の如くである。すなわち、歯周炎患者の歯肉溝から採取した滲出液中の当該酵素量は、単位時間あたりの滲出液量の増加(ペリオトロン値の増加)に比例して増大することが分かる(図4参照)。つまり、滲出液量が軽微な段階での当該酵素活性量は極めて低いが、滲出液量が増加するにつれてその活性量は増大し、中等度の症状ではその量は著しく増大し、重度になるとさらに増加することが判る。

【0034】滲出液量の増加と歯周炎の病状との間には相関関係があると一般に報告されていること(Cimasoni G.: Crevicular Fluid Updated. In: Myers HM, ed. Monographs in Oral Sciences. Basel, Karger, pp.1-152, 1983)や滲出液量と他の臨床パラメーター(歯肉指数や歯垢指数)との間にも相関関係があることを考えると、上記の結果は歯周病原性菌P. ジンジバリスの産生する当該酵素の活性量と歯周病の病勢との間には相関関係があることを示している。従って、本発明の方法を用いて得られた歯周病原性菌由来の酵素活性の測定値に基づいて、各歯周病患者における病状についてのより客観的判断が可能となるのである。

【0035】また、当該酵素は既に知られているP. ジンジバリス由来の50kDaシステインプロテアーゼ(ジンジペイン(gingipain); Chen Z, Potempa J, Polanowski A, Wikstrom M, Travis J: Purification and characterization of a 50-kDa cysteine proteinase (gingipain) from *Porphyromonas gingivalis*. J. Biol. Chem. 267:18896-18901, 1992)と至適pHやインヒビターに対する感受性等の酵素学的性質においては類似しているが、基質特異性や熱安定性等の性質においては相違し、また、当該酵素は公知の上記酵素では明らかにされていない以下のような歯周病に密接に関係した極めて重要な性質を有しており、新規酵素であることが明らかである。

【0036】すなわち、タイプIコラーゲンや免疫グロブリン等の蛋白質をよく分解すること(図5参照)、セルビンやシスタチン等の重要な生体由来のプロテアーゼインヒビターによって阻害を受けにくいこと、多形核白血球の機能を濃度依存性、時間依存性に抑制すること(図6及び図7参照)、また、血清型を異にするP. ジンジバリスの複数の株には共通して存在しているが、他の歯周病原性菌といわれる細菌や腸内細菌の培養上清には存在しない(表4参照)等、当該酵素がP. ジンジバリス特有の歯周病原性因子として歯周組織の直接破壊や生体の防御系の破壊等に重要な役割を持つことが明らかにされている。従って、歯周病患者の歯肉溝滲出液中の本発明酵素を測定することは歯周病の診断において有用である。

【0037】

表 4

培 養 上 清	プロテイン分解活性 (%)	
	Z-Phe-Arg-MCA	Boc-Phe-Ser-Arg-MCA
P. ジンジバリス		
381	100.0	100.0
ATCC 33277	60.8	78.0
W50	90.4	99.1
SU63	56.9	63.6
14018	91.4	98.2
1112	66.4	70.3
GAI 7802	72.7	82.8
P. インターメディア		
ATCC 25611	0.2	0.2
P. メラニノゲニア		
ATCC 25845	0.1	0.1
B. フラギリス		
RIMD 0230001	0.2	0.2
ATCC 25285	0.3	0.9
A. アクチノマイセテムコミタン ス		
ATCC 29522	0.3	0.2
ATCC 29523	0.5	1.0
S. ミュータンス		
6715	0.9	0.9
S. サングイス		
ATCC 10557	0.2	0.2
E. コリ		
W3350	0.2	0.1
S. チフィムリウム		
B2245	0.1	0.1
ブレイン・ハート・インフュージョ ンブロス (対照)	0.2	0.2
トリプティケース・ソイブロス (対照)	0.0	0.0

【0038】表4は、血清型を異にするP.ジンジバリスの複数の株の培養上清及び他の歯周病原性菌といわれる細菌や腸内細菌の培養上清に含まれる当該酵素活性量を2種の合成基質を用いて測定した結果を示すものであるが、本発明酵素がP.ジンジバリス特有のものであることが示されている。

【0039】従って、本発明に係る酵素は上記のような酵素学的性質を有することから、当該性質を指標として、通常ヒト口腔内に存在するP.ジンジバリスの培養上清から精製を行うことにより、目的とする上記酵素を得ることができる。

【0040】

【実施例】以下、実施例により本発明を詳細に説明する。

【0041】実施例 1

P.ジンジバリス由来酵素の精製および酵素学的性質：本発明の酵素は以下のようにして精製した。P.ジンジバリス 381株の培養上清に硫酸を加えて70%飽和とした。沈殿を遠心によって集め、非イオン性界面活性剤の0.05%ブリッジ35を含む10mMリン酸緩衝液(A液)に対して透析した。遠心透析上清をA液で平衡化したDEAEセファセルカラムにかけ、得られ

る非吸着分画を濃縮した後、さらにA液で平衡化したC
M-トヨパールカラムにかけた(図8)。

【0042】カラムを同緩衝液でよく洗浄した後、当該
酵素活性画分を70mM食塩を含む同緩衝液で溶出し
た。溶出画分は濃縮、透析の後、pH3.5~1.0の範
囲の等電点分離にかけた(図9参照)。活性画分(p
H5.0~5.5)を集め、濃縮、透析後、0.1M Na
₂SO₄を含む10mMリン酸緩衝液で平衡化したTS

KゲルG2000SWのゲル濾過を行って精製した(図
10参照)。

【0043】歯周病原性菌P. ジンジバリス由来酵素の
精製方法のプロトコールと、基質としてZ-Phe-A
rg-MCAを用いた時の活性量(全活性と比活性等)
の変化を表5に示す。

【0044】

表 5

工 程	プロテイン (mg)	全ユニット (U, ×10 ⁻³)	特異活性 (U/mg)	収 率 (%)	倍 数
硫安分画	1270	1450	1140	100	1
DEAE- セファセル	188	1130	6000	78	5
CM-トヨパール 650S	27	259	9600	18	8
等電点分離	11	168	15300	12	13
TSKゲル G 2000SW	7	116	16600	8	15

【0045】実施例 2

抗体の作成と特異性：本発明の酵素の測定方
法において使用する抗体は、以下のようにして作成し
た。P. ジンジバリスの培養上清から精製した当該酵
素液(約1mg)を等量のフロインド(Freund)の完全
アジュバントと混和し、その懸濁液を家兎の皮下に数ヶ
所に渡って注射し、これを2週間間隔で2回繰り返し
た。その後、ブースターを1回行って抗血清を採取し
た。

【0046】抗血清は硫安処理及びプロテイン A-セ
ファローズ(Protein A-Sepharose)(ファルマシア
社、スエーデン)カラムクロマトグラフィーによってI
gG分画として測定に供した。抗体の特異性は、対照
として用いた当該酵素を含まないフロインド完全アジュ
バントのみを投与した家兎から得たIgG分画が当該酵
素活性を全く中和しないことやウエスタンブロッティング
での非反応性によって確認される。また、当該酵素に
対する抗体は他の歯周病原性細菌の培養上清のいかなる
プロテアーゼ活性も阻害しないことから、極めて特異性
の高い有用なものである。

【0047】実施例 3

酵 素 の 測 定 方 法：本発明のP. ジンジバリス由
来の酵素の測定方法は以下のようにして行った。まず、
基質としてZ-Phe-Arg-MCA又はBoc-P
he-Ser-Arg-MCAを用い、被検溶液にこの
基質溶液(10μM基質/5mMシステイン/20mM
リン酸緩衝液、pH7.5)を加え、40℃で10分間
インキュベーションする。反応を同量の10mMヨ-

ド酢酸溶液(pH5)を加えて止め、遊離したAMC量
を蛍光分光光度計を用いた蛍光測定(励起波長380nm
、蛍光波長460nm)によって決定する。この
時、EDTA(10mM)及びロイペプチン(50μ
M)の存在下で同様の測定を行い、いずれの物質でも阻
害される活性量が当該酵素量となる。

【0048】更に、被検溶液の一部に当該酵素に対する
特異抗体を加え、37℃で10分間反応させた後、反応
液を遠心分離して固相(免疫複合体)と液相に分離し、
液相中の上記基質に対する分解活性を測定して固相へ移
行した活性量を算出すれば、より正確に当該酵素量を測
定することができる。

【0049】

【発明の効果】本発明は客観的且つ簡便な歯周病原性菌
由来酵素の測定方法を提供するものである。本発明の
酵素の測定方法を用いることにより、従来、客観的に診
断することが困難であった歯周病の進行状況と活動度を
経験に依存することなく的確に把握することが可能とな
り、歯科領域の治療法において大きく貢献するものであ
る。また、本発明の酵素に対する抗体は、分析用試薬の
他、本発明酵素の有する多形核白血球の反応抑制効果を
阻害することからみて(図11参照)、歯周病の予防、
治療剤としての利用も期待できる。

【0050】

【配列表】配列番号：1

配列の長さ：991

配列の型：アミノ酸

トポロジー：

配列の種類: ペプチド
配列

【化3】

```

TTTAATGCATAAATACAGAAGGGGTACTACACAGTAAATCATATCTAATTTCATCAAA 60
ATGAAAACTTGAACAAGTTTGTTCGATTGCTCTTTGCTCTTCCTTATTAGGAGGAATG 120
M K N L N K F V S I A L C S B L L G G M 20
GCATTTGCGCAGCAGACAGAGTTGGGACGCAATCCGAATGTCAGATTGCTCGAATCCACT 180
A F A Q Q T E L G R N P N V R L L E S T 40
CAGCAATCGGTGACAAAGGTTCACTTCCTGATGGACAACTCAAGTTCACCGAAGTTCAA 240
Q Q S V T K V Q P R M D N L K P T E V Q 60
ACCCCTAAGGGAATGGACAAAGTCCGACCTTATACAGAAGGGGTTAATCTTTCCGAAAAA 300
T P K G M A Q V P T Y T E G V N L S E K 80
GGGATGCTACGCTTCOCATTCTATCAGGCTCTTTGGCGGTTTCAGACACTCGTGAGATG 360
G M P T L P I L S R S L A V S D T R E M 100
AAGGTAGAGGTTGTTTCTCAAGTTCATCGAAAGAAAAATGCTCTGATTGCAACCTCC 420
K V E V V S S K F I E K K N V L I A P S 120
AAGGGCATGATTATGCGTAACGAAGATCCGAAAAAGATCCCTTACGTTTATGAAAGAGC 480
K G M I M R N E D P K K I P Y V Y G K S 140
TACTCGCAAAACAAATCTTCOCGGGAGAGATCGCCACGCTTGATGATCCTTTTATCCTT 540
Y S Q N K F F P G E I A T L D D P F I L 160
CGTGATGCTGCTGGCAGGTTGTAAACITTCGCGCTTTGCAAGTATAACCTGTGACAAAAG 600
R D V R G Q V V N F A P L Q Y N P V T K 180
ACGTTGCGCATCTATACGGAAATCACTGTGGCAGTGAGCGAAACITTCGGAACAAGGCAAA 660
T L R I Y T E I T V A V S E T S E Q G K 200
AATATTCTGAACGAAGGATACATTTCGCGCTTTGAAGACACATACAGCGCATGTTTC 720
N I L N K K G T F A G F E D T Y K R M F 220
ATGAACCTACGAGCCGGGCGTTACACACCGGTAGAGGAAAAACAAATGGTCTGATGATC 780
M N Y E P G R Y T P V E E K Q N G R M I 240
GTCATCGTAGCCAAAGATGATGAGGGAGATATTAAGATTTCGTTGATTGGAACAAACCAA 840
V I V A K K Y E G D I K D F V D W K N Q 260
CGCGGTCTCGTACOGAGGTTGAAAGTGGCAGAGATATTGCTTCCTCCGTTACAGCTAAT 900
R G L R T E V K V A E D I A S P V T A N 280
GCTATTTCAGCAGTTGCTTAAGCAAGATACGAGAAAGAGGTAATGATTGACCTATGTT 960
A I Q Q P V K Q E Y E K E G N D L T Y V 300
CTTTTGGTTGGCGATCACAAAGATATTCCTGCCAAATTAATCCGCGGATCAAAATCCGAC 1020
L L V G D H K D I P A K I T P G I K S D 320
CAGGTATATGGACAAATAGTAGGTAAATGACCACTACACGAAGTCTTCATCGGTCTGTTTC 1080
Q V Y G Q I V G N D H Y N E V F I G R F 340
TCATGTGAGAGCAAAGAGGATCTGAAGACACAAATCGATCGGACTATTCACTATGAGCGC 1140
S C E S K E D L K T Q I D R T I H Y E R 360
AATATAACCAACGGAAGACAAATGGCTCGGTCAAGGCTCTTTGTATTGCTTCGGCTGAAGGA 1200
N I T T E D K W L G Q A L C I A S A E G 380
GGCCCATCGCAGACAAATGGTGAAGTGATATCCAGCATGAGAAATGTAATCGCCAATCTC 1260
G P S A D N G E S D I Q H E N V I A N L 400
CTTAACCACTATGGCTATACCAAGATTATCAAAATGTTATGATCCGGGAGTAACCTCTAAA 1320
L T Q Y G Y T K I I K C Y D P G V T P K 420
AACATTATTGATGCTTTCAAGGAGGAATCTCGTTGGTCAACTATACGGGCCACGGTAGC 1380
N I I D A F N G G I S L V N Y T G H G S 440
GAAACAGCTTGGGATACGTCTCACTTCGGCACCACTCATGTGAAGCAGCTTACCAACAGC 1440
E T A W G T S H F G T T H V K Q L T N S 460
AACCAGCTACCGTTTATTTTCACGTAGCTTGTGTGAATGGCGATTCTATTCAGCATG 1500
N Q L P F I F D V A C V N G D F L F S M 480
CCTTGCTTCGCAAGCCCTGATGCGTGCACAAAAGATGGTAAGCCGACAGGTACTGTT 1560
P C F A E A L K R A Q K D G K P T G T V 500
GCTATCATAGCCTCTACGATCAACCACTCTTCGGCTCTCTATGCGCGGCGCAGGATGAG 1620
A I I A S T I N Q S W A S P M R G Q D E 520
ATGAAGAAATTCGTGCGAAAAACCCGGAACACATCAAGCGTACTTTCGGTGGTGTG 1680
M N E I L C E K H P N N I K R T F G G V 540
ACCATGAACGGTATGTTTCTATGCTGGTGAAGATATAAAAGGATGGTGAGAAGATGCTC 1740
T M N G M F A M V E K Y K K D G E K M L 560

```

【化4】

```

GACACATGGACTGTTTTCGGCGACCCCTCGCTGCTGTTCTGACACTTGTCCCGACCAAA 1800
D T W T V F G D P S L L V R T L V P T K
ATGCAGGTTACGGCTCCGGCTCAGATTAAATTTGACGGATGCTTCAGTCAACGTATCTTGC 1860
M Q V T A P A Q I N L T D A S V N V S C
GATTATAATGGTGCTATTGCTACCATTTGACCCAATGGAAGATGTTGGGTTCTGCAGTT 1920
D Y N G A I A T I S A N G K M F G S A V
GTCGAAAATGGAACAGCTACAATCAATCTGACAGGCTGACAAATGAAAGCAAGCTTACC 1980
V E N G T A T I N L T G L T N E S T L T
CTTACAGTAGTTGGTTACAACAAAGAGACGGTTATTAAAGACCATCAACACTAATGGTGAG 2040
L T V V G Y N K E T V I K T I N T N G R
CCTAACCCCTACCAGCCCGTTTCCAACTTGACAGCTACAACGCGAGGTCAGAAAGTAACG 2100
P N P Y Q P V S N L T A T T Q Q K V T
CTCAAGTGGGATGCAACGAGCAGAAAACCAATGCAACCACTAATACCGCTCGCAGCGTG 2160
L K W D A P S T K T N A T T N T A R S V
GATGGCATACGAGAATTGGTTCTTCTGTCAGTCAGCGATGCCCCGAACTTCTTCGCAGC 2220
D G I R E L V L L S V S D A P E L L R S
GGTCAGGCGAGATTGTTCTTGAAGCTCAGGATGTTTGAATGATGGATCCGGTTATCAG 2280
G Q A E I V L E A H D V W N D G S G Y Q
ATTCTTTTGGATGCAGACCATGATCAATATGACAGGTTATACCCAGTGATACCCATACT 2340
I L L D A D H D Q Y G Q V I F S D T H T
CTTTGGCGAACTGTAGTGTCCCGGCAATCTGTGCTCCGTTGCAATATACCTTCCG 2400
L W P N C S V P A N L F A P F E Y T V P
GAAATGCGAGTCTTCTTCTCCCTACCAATATGATAATGGATGGTACTGCACTCCGTT 2460
E N A D P S C S P T N M I M D G T A S V
AATATACCGGCGAACTATGACTTTGCAATTGCTGCTCTCTCAAGCAATGCAAGATT 2520
N I P A G T Y D F A I A A P Q A N A K I
TGGATTGCGGACAAAGGACGACGAAAGAGTATTGATTGTAAGCCGGTAAAAA 2580
W I A G Q G P T K E D D Y V F E A G K K
TACCAATTCCTTATGAAGAAGATGGTAGCGGTGATGGAACCTCAATTGACTATAAGCGAA 2640
Y H F L M K K M G S G D G T E L T I S E
GGTGGTGAAGCGATTACACCTATCTGCTATCTGACGGCAGCAAGATCAAGGAAGGT 2700
G G S D Y T Y T V Y R D G T K I K E G
CTGACCGAAACGACCTACCGGATGACGGAATGAGTGCAAACTCTCATGATATTGCGTA 2760
L T E T T Y R D A G M S A Q S H E Y C V
GAGGTTAAGTACGACGCGCGGTATCTCCGAAGGTTTGTGTTGATTATATTCCTGACGGA 2820
E V K Y A A G V S P K V C V D Y I P D G
GTGGCAGACGTAACGGCTCAGAAGCCTTACACGCTGACAGTTGTTGGAAAGACGATCAG 2880
V A D V T A Q K E P Y T L T V V G K T I T
GTAACTTCCCAAGCGCAAGCTATGATCTACGACATGAACGGTCTGCTGTCGACGCGGT 2940
V T C Q G E R M I Y D M N G R R L A A G
CGCAACACAGTTGTTTACACGGCTCAGGGCGGTACTATGCAGTCATGGTTGCTGTTGAC 3000
R N T V V Y T A Q G G Y Y A V M V V V D
GCCAAGTCTTACGTAGAGAACTCGCTGTAAGTAATCTCTGCTGACTCGGAGACTTT 3060
G K S Y V E K L A V K *
GTGCAGACACTTTTAAATATAGGTCTGTAATTGTC 3094

```

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明酵素が2種類の合成基質を分解する際のpHの影響を示す図面。

【図2】 本発明酵素の熱安定性を示す図面。

【図3】 歯周病原性菌、P. ジンジバリス培養上清の有する多形核白血球のケイルミネッセンス反応抑制作用に対する、各種プロテアーゼインヒビターの作用を示す図面。

【図4】 歯周病患者の歯肉溝分泌液中に含まれる本発明酵素量を示す図面。測定は基質としてBoc-Phe-Ser-Arg-MCAを用いた。図中1ユニットは、40℃において、1分当り1μmolのAMCを遊離させるのに必要な量を意味し、ペリオトロン値の1ユニットは、GCF0.005μlに対応する。

【図5】 本発明酵素によるヒト由来コラーゲンタイプI (lane 2, 3) およびタイプIV (lane 4, 5) の分解パターンを示す図面。各コラーゲンを当該酵素と20℃(A)または37℃(B)で10時間インキュベーションした後、SDSゲル電気泳動を行った。レーン1は分子量マーカー、レーン2および4は当該酵素非存在下、レーン3および5は当該酵素(1μg)存在下でそ

れぞれ処理をした。

【図6】 精製された本発明酵素(5μg)を用いて多形核白血球(2×10⁶個)のケイルミネッセンス反応に対する抑制効果を経時的に調べた結果を示す図面。

【図7】 本発明酵素による多形核白血球のケイルミネッセンス反応抑制効果に対する濃度依存性を示す図面。黒丸は当該酵素に1mMシステインを加えたもの、白丸は酵素のみを加えたもの、黒三角は酵素に1mMシステインと40μg/mlのロイペプチンを加えたものを示す。

【図8】 本発明酵素のCMトヨパールでのゲル濾過パターンを示す図面。

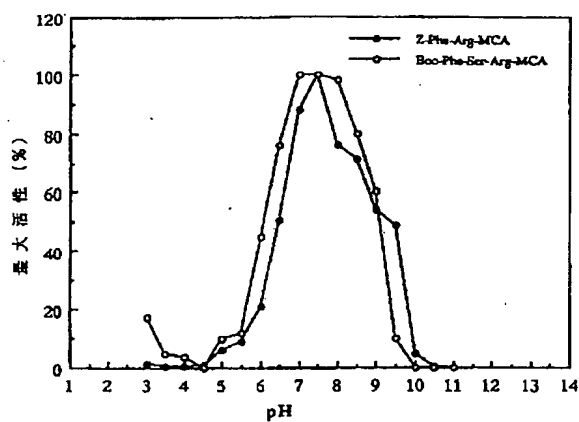
【図9】 本発明酵素のカラム等電点電気泳動での分布パターンを示す図面。

【図10】 精製された本発明酵素のゲル電気泳動パターンを示す図面。単一のバンドが見られることから、当該酵素は均一にまで精製されていることが分かる。

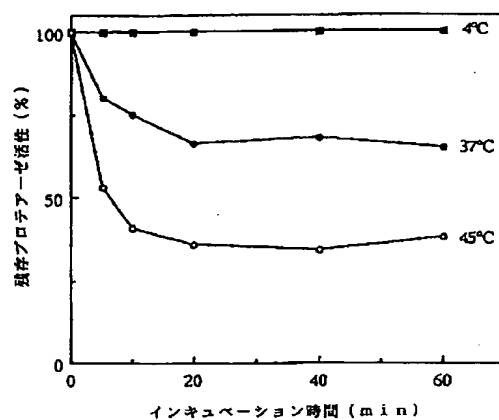
【図11】 本発明酵素に対する特異抗体が当該酵素の有する多形核白血球のケイルミネッセンス反応抑制効果を阻害することを示す図面。

以上

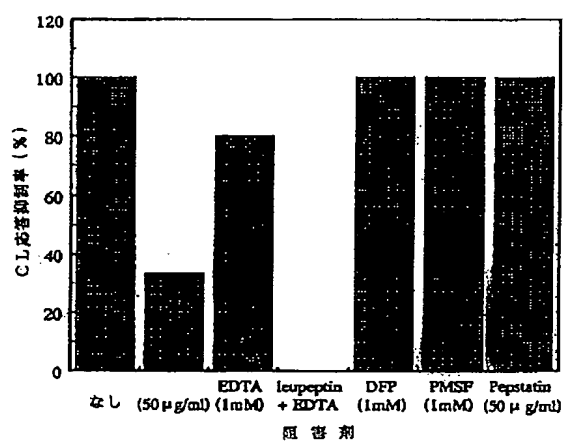
【図1】



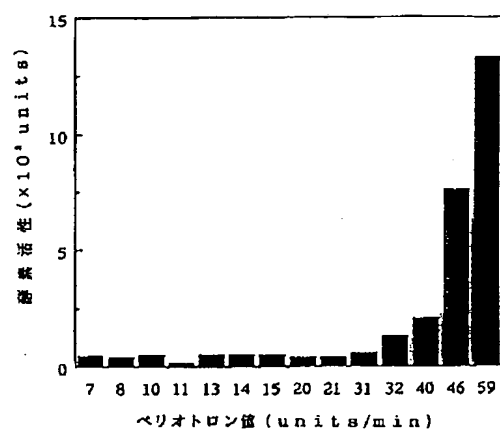
【図2】



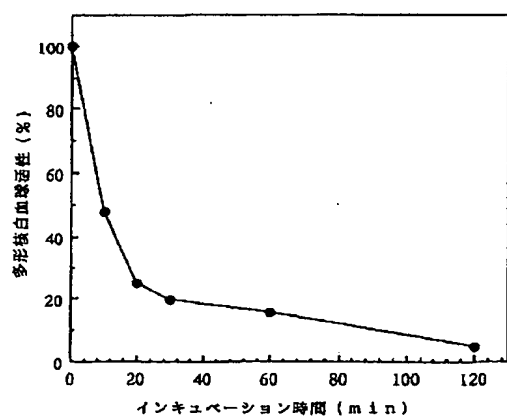
【図3】



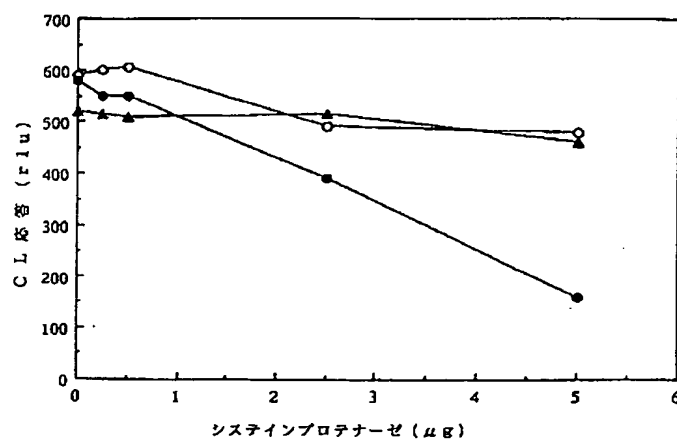
【図4】



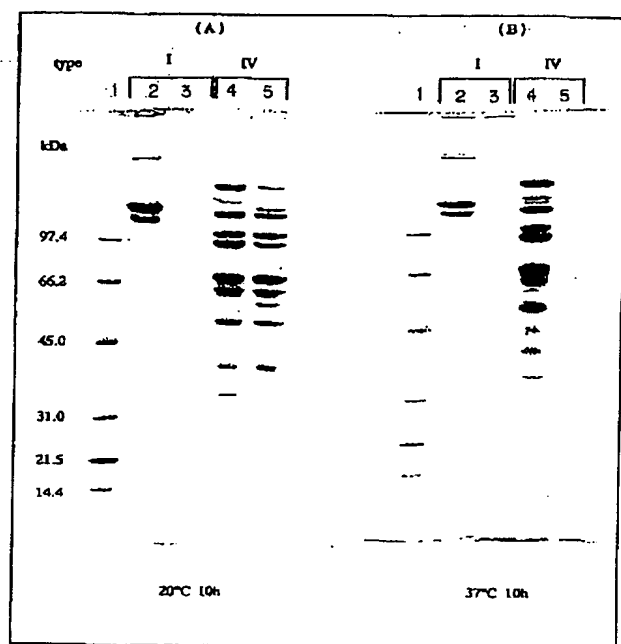
【図6】



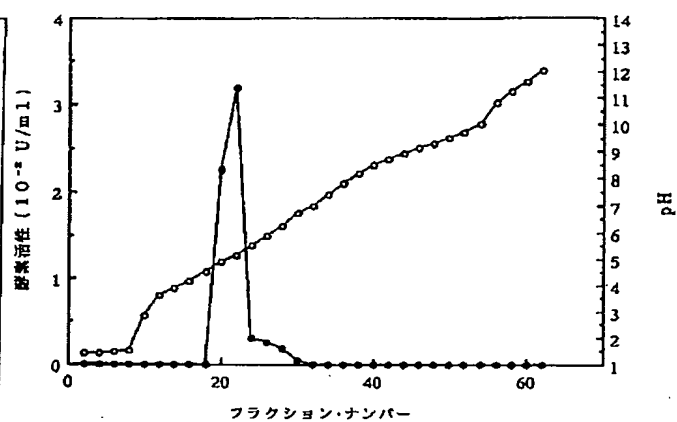
【図7】



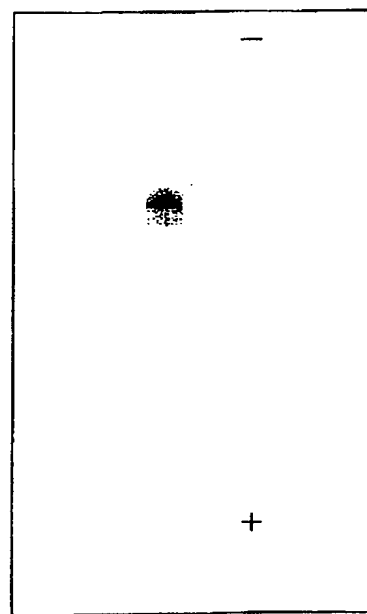
【図5】



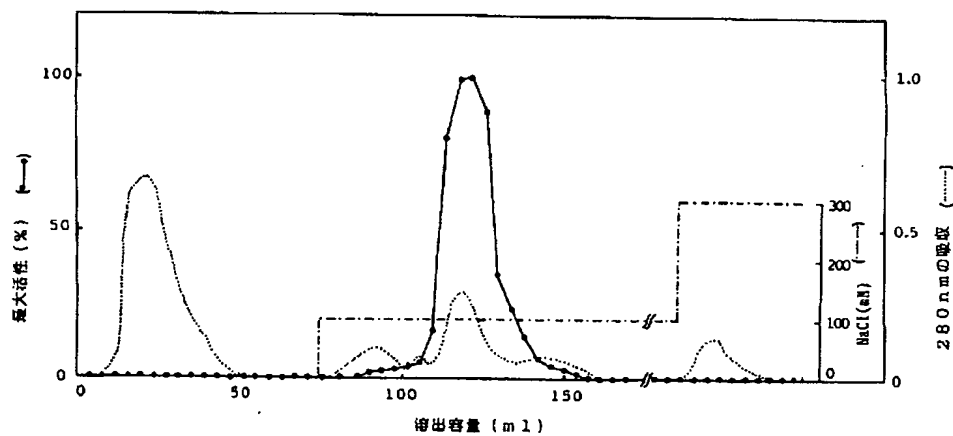
【図9】



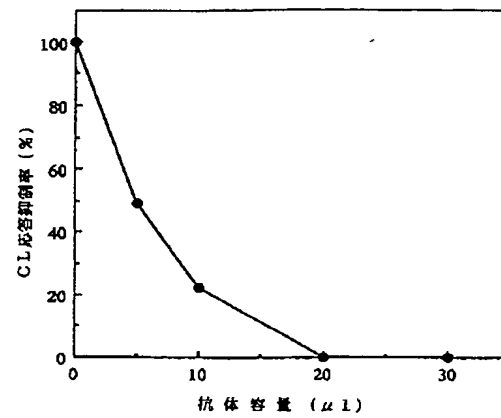
【図10】



【図8】



【図11】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号 序内整理番号

F I

技術表示箇所

//(C 1 2 N 9/50

C 1 2 R 1:01)